

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/252932 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6869 (2018.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/018864

(22) 国際出願日: 2024年5月22日(22.05.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-092968 2023年6月6日(06.06.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 岡田 随象 (OKADA, Yukinori); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 佐々 暢亜 (SASA, Noah); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

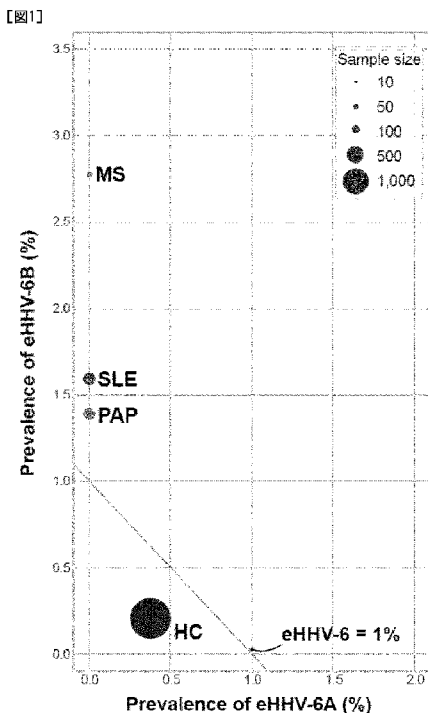
パリッシュ ニコラス フレドリック (PARRISH, Nicholas Fredric); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 小嶋 将平 (KOJIMA, Shohei); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING AUTOIMMUNE DISEASE

(54) 発明の名称: 自己免疫疾患を検査する方法



(57) Abstract: Provided is a technique for examining an autoimmune disease. This method for examining an autoimmune disease involves (1) a step for examining the presence or absence of endogenous human herpesvirus 6B in genomic DNA of a biological sample sampled from a subject.

(57) 要約: 自己免疫疾患の検査技術を提供すること。

(1) 被検体から採取された生体試料のゲノムDNAにおける内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる工程を含む、自己免疫疾患を検査する方法。

SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：自己免疫疾患を検査する方法

技術分野

[0001] 本発明は、自己免疫疾患を検査する方法等に関する。

背景技術

[0002] 全身性エリテマトーデス、肺胞蛋白症、多発性硬化症等の自己免疫疾患の多くは単一のバイオマーカーによる診断が困難であり、複数の血液学的所見や組織学的所見、臨床症状を組み合わせることで初めて診断が可能となる。しかし、組織学的検査の侵襲度の高さや診断の専門性の高さなど、診断には解決すべき課題が多く存在しており、新規バイオマーカーの発見が望まれている。

[0003] ヒトヘルペスウイルス6は、突発性発疹の原因ウイルスとして知られている。一部のヒトにおいては、ヒトヘルペスウイルス6が、宿主であるヒトのゲノムDNAに挿入された状態（内在性ヒトヘルペスウイルス6）で存在している（非特許文献1）。しかし、内在性ヒトヘルペスウイルス6と疾患との関連については不明な点が多い。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Liu, X. et al. Endogenization and excision of human herpesvirus 6 in human genomes. PLoS Genet 16, e1008915 (2020).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、自己免疫疾患の検査技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は上記課題に鑑みて鋭意研究を進めた結果、（1）被検体から採取された生体試料のゲノムDNAにおける内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる工程を含む、自己免疫疾患を検査する方法、であれば、上記課題を解

決できることを見出した。本発明者はこの知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本発明を完成させた。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

[0007] 項 1. (1) 被検体から採取された生体試料のゲノムDNAにおける内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる工程を含む、自己免疫疾患を検査する方法。

[0008] 項 2. さらに、

(2a) 前記工程 (1) で前記内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが検出された場合に、前記被検体が、前記自己免疫疾患に罹患している、前記自己免疫疾患の発症リスクが高い、又は前記自己免疫疾患の重症化リスクが高いと判定する工程、及び／又は

(2b) 前記工程 (1) で前記内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが検出されなかった場合に、前記被検体が、前記自己免疫疾患に罹患していない、前記自己免疫疾患の発症リスクが低い、又は前記自己免疫疾患の重症化リスクが低いと判定する工程

を含む、項 1 に記載の方法。

[0009] 項 3. 前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス、肺胞蛋白症、及び多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1種である、項 1 又は 2 に記載の方法。

[0010] 項 4. 前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス、及び肺胞蛋白症からなる群より選択される少なくとも1種である、項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

[0011] 項 5. 前記重症化リスクの判定における前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデスである、項 2 に記載の方法。

[0012] 項 6. 前記生体試料が、体液、皮膚、及び粘膜からなる群より選択される少なくとも1種である、項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

[0013] 項 7. 日本人集団に対して適用される、項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

[0014] 項 8. 内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出剤を含む、項 1 ～ 7 のい

れかに記載の方法に使用するための検査薬。

[0015] 項 8 A. 内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出剤の、項 1～7のいずれかに記載の方法に使用するための検査薬の製造のための使用。

[0016] 項 8 B. 項 1～7のいずれかに記載の方法に使用するための検査薬としての使用のための、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出剤。

[0017] 項 8 C. 内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出剤の、項 1～7のいずれかに記載の方法に使用するための検査薬としての使用。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、自己免疫疾患を検査する方法、自己免疫疾患の検査薬等を提供することができる。本発明による検査は、被検体のゲノムDNA内に存在する内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を指標とするものであるので、生体のいずれの組織・体液の細胞も被検試料とすることができ、またより早期に発症リスク等を判定することが可能である。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]eHHV-6Aの有病率とeHHV-6Bの有病率を示す。自己免疫疾患の被験者と健常対照におけるeHHV-6Aの有病率とeHHV-6Bの有病率の散布図を示し、マーカーサイズは各疾患のサンプルサイズを示す。赤線はeHHV-6の有病率＝1％であることを示す。

[図2]eHHV-6BとSLEDAIスコアと有意な正の相関を示す。グラフは、eHHV-6Bを持たないSLE患者と持たないSLE患者のSLEDAIスコアの箱ひげ図を示す。eHHV-6Bを持つ被験者のSLEDAIスコアは、eHHV-6Bを持たない被験者に比べて有意に高かった（SLEのeHHV-6B陽性患者と陰性患者の平均SLEDAI = 30.5 と 6.0; Wald検定 $P = 1.3 \times 10^{-8}$ ）。ヒストグラムは、eHHV-6Bを持たないSLEと持つSLEの患者数の分布を示す（上段）。横のヒストグラムは、eHHV-6Bを持たないSLE患者と持たないSLE患者のSLEDAIスコアの分布を、色を変えて示している（右パネル）。

発明を実施するための形態

[0020] 本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有

」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

[0021] 1. 検査方法

本発明は、その一態様において、(1) 被検体から採取された生体試料のゲノムDNAにおける内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる工程を含む、自己免疫疾患を検査する方法（本明細書において、「本発明の検査方法」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

[0022] 検査対象である自己免疫疾患の種類は、特に制限されない。自己免疫疾患の各種分類基準における全てのクラス、グレード、ステージの自己免疫疾患が検査対象となる。また、病変部位も特に制限されない。自己免疫疾患としては、検査精度等の観点から、とりわけ好ましくは全身性エリテマトーデス、肺胞蛋白症、多発性硬化症等が挙げられる。本発明の一態様において、自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、及び肺胞蛋白症からなる群より選択される少なくとも1種である。また、後述の重症化リスクの判定精度の観点からは、自己免疫疾患は、特に好ましくは全身性エリテマトーデスである。

[0023] 被検体は、ヒトヘルペスウイルス6Bの宿主となり得る哺乳動物である限り特に制限されない。被検体は、好ましくはヒトである。

[0024] 被検体の状態は、特に制限されない。被検体としては、例えば自己免疫疾患に罹患しているかどうか不明な検体、自己免疫疾患に罹患していると既に別の方法により判定されている検体、自己免疫疾患に罹患していないと既に別の方法により判定されている検体、自己免疫疾患の治療中の検体等が挙げられる。本発明の検査方法によれば、例えば

自己免疫疾患に罹患しているかどうか不明な検体の罹患判定、発症リスク、及び重症化リスク； 自己免疫疾患に罹患している被検体の重症化リスク；

自己免疫疾患に罹患していない被検体の発症リスク、及び重症化リスクを検査することができる。なお、本明細書において、「発症リスク」とは発症する可能性を意味し、「重症化リスク」とは重症化する可能性を意味する。

[0025] 本発明の検査方法は、多様な人種に対して適用することができる。本発明

の検査方法は、一態様において、日本人集団に対して適用することができる。日本人集団は、字義通りであり特に制限されないが、例えばミトコンドリアゲノムDNAの塩基配列、Y染色体の塩基配列等から、判定することができる。例えば、特定の塩基配列を有するか否か、又は特定のハプログループの割合から、日本人集団であるか否か判定することができる。より具体的な例としては、Y染色体ハプログループD1a2aを有する被検体が男性被検体の20%以上（好ましくは30%以上）であり且つY染色体ハプログループ01b2を有する被検体が男性被検体の5%以上（好ましくは10%以上）である集団を、日本人集団と定義することができる。

[0026] 本発明の検査方法が適用される被検体集団の数は、特に制限されないが、例えば10以上、好ましくは50以上、より好ましくは100以上、よりさらに好ましくは1000以上である。

[0027] 生体試料は、被検体の細胞の核に含まれる染色体ゲノムDNAを含むものである限り、特に制限されない。生体試料としては、例えば体液、皮膚、粘膜、体内組織等が挙げられる。これらの中でも、採取の容易性、低侵襲性の観点から、好ましくは体液、皮膚、粘膜、より好ましくは体液が挙げられる。

[0028] 体液としては、例えば血液、卵胞液、経血、唾液、髄液、関節液、尿、組織液、汗、涙等が挙げられる。粘膜としては、例えば口腔粘膜、鼻粘膜等が挙げられる。

[0029] 生体試料は、生体から採取したそのままのものであってもよいし、ゲノムDNAを濃縮、精製等して得られる試料であってもよい。

[0030] 生体試料は、1種単独で採用してもよいし、2種以上を組み合わせ採用してもよい。

[0031] 生体試料は、当業者に公知の方法で被検体から採取することができる。例えば、全血は、注射器などを用いた採血によって採取することができる。なお、採血は、医師、看護師などの医療従事者が行うことが望ましい。血清は、血液から血球及び特定の血液凝固因子を除去した部分であり、例えば、血液を凝固させた後の上澄みとして得ることができる。血漿は、血液から血球

を除去した部分であり、例えば、血液を凝固させない条件下で遠心分離に供した際の上澄みとして得ることができる。

[0032] 工程(1)では、被検体のゲノムDNAにおける内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる。本発明では、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが有る場合、被検体が、自己免疫疾患に罹患している、自己免疫疾患の発症リスクが高い、又は自己免疫疾患の重症化リスクが高いと判定できること、また、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが無い場合、被検体が、自己免疫疾患に罹患していない、自己免疫疾患の発症リスクが低い、又は自己免疫疾患の重症化リスクが低いと判定できることを見出し、これに基づいて、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べることにより自己免疫疾患を検査する技術を開発した。

[0033] 内在性ヒトヘルペスウイルス6Bは、被検体の染色体ゲノムDNA内に挿入されているヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNAであり、その限りにおいて特に制限されない。

[0034] ヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNAの塩基配列は公知(NCBI Reference Sequence: NC_000898.1)であり、配列番号1で示される。

[0035] 内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる方法としては、特定の塩基配列のDNAを特異的に検出可能な方法である限り特に制限されず、各種公知の方法又は当該方法に準じた方法を採用することができる。当該方法としては、例えばPCR(例えばリアルタイムPCR)、DNAマイクロアレイ、サザンハイブリダイゼーション法、DNAシーケンシング法等が挙げられる。

[0036] 上記方法においては、DNAに対する結合性分子(例えばプライマー、プローブ等)を使用することができる。プライマー対及びプローブは、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの塩基配列に基づいて合成することができる。プライマー及びプローブの塩基長は特に限定されない。プライマーの塩基長は、例えばヌクレオチド10~50個、好ましくは15~30個とすることができる。プローブの塩基長は、例えばヌクレオチド10個~5000個、好ましくは10個~1000個、より好ましくは20~150個とすることができる。

[0037] プライマー対及びプローブは、RNA、DNA等の天然核酸の他、必要に応じて天然核酸と化学修飾核酸や擬似核酸を組み合わせることもできる。化学修飾核酸や擬似核酸には、例えば、PNA(Peptide Nucleic Acid)、LNA(Locked Nucleic Acid;登録商標)、メチルホスホネート型DNA、ホスホロチオエート型DNA、2'-O-メチル型RNA等が挙げられる。また、プライマー及びプローブは、蛍光物質及び／又はクエンチャー物質、又は放射性同位元素（例えば、³²P、³³P、³⁵S）等の標識物質、あるいはビオチン若しくは（ストレプト）アビジン、又は磁気ビーズ等の修飾物質を用いて標識又は修飾してもよい。

[0038] 標識物質は、限定されず、市販のものを用いることができる。例えば、蛍光物質であればFITC、Texas、Cy3、Cy5、Cy7、Cyanine3、Cyanine5、Cyanine 7、FAM、HEX、VIC、フルオレサミン及びその誘導体、及びローダミン及びその誘導体等を用いることができる。クエンチャー物質であれば、AMRA、DABCYL、BHQ-1、BHQ-2、又はBHQ-3等を用いることができる。プライマー及びプローブにおける標識物質の標識位置は、その修飾物質の特性や、使用目的に応じて適宜定めればよい。一般的には、5' 又は3' 末端部に修飾されることが多い。また、1本のプライマー及びプローブ分子が1種類以上の標識物質で標識されていてもかまわない。プライマー及びプローブのヌクレオチド配列の設計、標識物質の選択は公知であり、Sambrook, J及びRussell, DWによるMolecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 等の分子生物学の実験プロトコール書に開示されている。

[0039] 工程（1）でその有無を調べる内在性ヒトヘルペスウイルス6Bは、全長である必要は無く、ヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNAが存在すると一定の確率で判定できる限り、長さは特に制限されない。当該長さは、例えば50～300塩基長、好ましくは80～200塩基長である。

[0040] また、工程（1）でその有無を調べる内在性ヒトヘルペスウイルス6Bは、ヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNA中の連続した1つの領域であってもよいし、ヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNA中の重複しない又は一部重複する2つ

以上の領域であってもよい。当該領域の数は、例えば2～20又は3～10とすることができる。

[0041] ヒトヘルペスウイルス6Aは、ヒトヘルペスウイルス6Bと高い同一性の塩基配列を有する。工程（1）では、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bを検出できる限り、内在性ヒトヘルペスウイルス6Aも同時に検出できる方法であってもよいが、検査精度の観点から、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bを特異的に検出できる（内在性ヒトヘルペスウイルス6Aが検出され難い又は検出されない）方法であることが好ましい。内在性ヒトヘルペスウイルス6Bを特異的に検出する場合は、例えば、ヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNA配列とヒトヘルペスウイルス6AのゲノムDNA配列（NCBI Reference Sequence: NC_001664.4）とを比較し、ヒトヘルペスウイルス6BのゲノムDNA配列には存在する配列であり、且つヒトヘルペスウイルス6AのゲノムDNA配列には存在しない又はその一部しか存在しない配列を検出対象領域とすることができる。

[0042] 工程（1）を含む本発明の検査方法によれば、自己免疫疾患の検査指標である内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無に関する情報を提供することができる、これにより自己免疫疾患の発症／重症化リスク評価、自己免疫疾患の診断などを補助することができる。

[0043] 工程（1）を含む本発明の検査方法による検査結果は、自己免疫疾患の病態解明、自己免疫疾患の予後予測、患者層別化、治療方法の選択（個別化医療、治療反応性）等に利用し得る。

[0044] 本発明の検査方法は、一態様として、

（2a）前記工程（1）で前記内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが検出された場合に、前記被検体が、前記自己免疫疾患に罹患している、前記自己免疫疾患の発症リスクが高い、又は前記自己免疫疾患の重症化リスクが高いと判定する工程、及び／又は

（2b）前記工程（1）で前記内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが検出されなかった場合に、前記被検体が、前記自己免疫疾患に罹患していない、前記自己免疫疾患の発症リスクが低い、又は前記自己免疫疾患の重症化リスクが低いと

判定する工程

を含むことが好ましい。

[0045] 2. 自己免疫疾患のより高い精度での診断

工程（2）を含む本発明の検査方法により、被検体が自己免疫疾患に罹患していると判定された場合、本発明の検査方法に、さらに自己免疫疾患の医師による診断を適用する工程を組み合わせることによって、より高い精度で自己免疫疾患を診断することができる。また、本発明の検査方法はより正確に自己免疫疾患を検出できるので、本発明の検査方法に上記工程を組み合わせることによって、より効率的且つより正確に「自己免疫疾患に罹患している」と診断できる。

[0046] 3. 自己免疫疾患の予防・治療

工程（2）を含む本発明の検査方法により被検体が自己免疫疾患に罹患していると判定された場合は本発明の検査方法に対してさらに、或いは上記「2. 自己免疫疾患のより高い精度での診断」に記載の様に自己免疫疾患に罹患していると診断された場合は本発明の検査方法と医師による診断を適用する工程との組合せに対してさらに、（3）自己免疫疾患に罹患していると判定又は診断された被検体に対して、該疾患の治療を行う工程を行うことによって、被検体の該疾患を治療することが可能となる。また、本発明の検査方法はより正確に自己免疫疾患を検出できるので、本発明の検査方法に対して、或いは本発明の検査方法と医師による診断を適用する工程との組合せに対して工程（3）を組み合わせることによって、自己免疫疾患に罹患している被検体をより効率的に、より確実に治療できる。また、工程（2）を含む本発明の検査方法に被検体の自己免疫疾患の発症リスクが高いと判定された場合は、適切な予防処理を採ることができる。

[0047] 自己免疫疾患の治療方法は、特に制限されないが、代表的には投薬治療が挙げられる。投薬治療に用いる医薬としては、特に制限されないが、例えば全身性エリテマトーデスの治療薬としては例えば非ステロイド系消炎鎮痛剤、ステロイド剤等が挙げられ、多発性硬化症の治療薬としては例えばインタ

ーフェロン製剤、フィンゴリモド等の免疫抑制剤、 $\alpha 4$ インテグリン抗体、CD 20抗体等が挙げられる。医薬は、1種、2種、又は3種以上を組み合わせる用いることができる。また、肺胞蛋白症に対しては、全肺洗浄が行われる。

[0048] 自己免疫疾患の予防方法は、特に制限されないが、例えば発症誘因因子及び／又は増悪因子の忌避及び／又は抑制（具体的には、例えば日光曝露の抑制、日焼け止めの塗布、ウイルス感染の抑制、ストレス因子の抑制、ホルモン剤等の薬剤の忌避・抑制等）が挙げられる。これらは、1種、2種、又は3種以上を組み合わせる用いることができる。

[0049] 4. 検査薬

本発明は、その一態様において、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出剤を含む、本発明の検査方法に使用するための検査薬（本明細書において、「本発明の検査薬」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

[0050] 本発明の検出剤は、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bを検出できるものである限り特に制限されない。該検出剤としては、例えば内在性ヒトヘルペスウイルス6Bに対するプライマー、プローブ等が挙げられる。

[0051] 本発明の検出剤は、その機能が著しく損なわれない限りにおいて、修飾が施されていてもよい。修飾としては、例えば、標識物、例えば蛍光色素、酵素、タンパク質、放射性同位体、化学発光物質、ビオチン等の付加が挙げられる。

[0052] 本発明において用いられる蛍光色素としては、一般にヌクレオチドを標識して、核酸の検出や定量に用いられるものが好適に使用でき、例えば、HEX（4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxylfluorescein、緑色蛍光色素）、フルオレセイン（fluorescein）、NED（商品名、アプライドバイオシステムズ社製、黄色蛍光色素）、あるいは、6-FAM（商品名、アプライドバイオシステムズ社製、黄緑色蛍光色素）、ローダミン（rhodamin）またはその誘導体〔例えば、テトラメチルローダミン（TMR）〕を挙げることができるが、これらに限定されない。蛍光色素でヌクレオチドを標識する方法は、公知の標

識法のうち適当なものを使用することができる〔Nature Biotechnology, 14, 303-308 (1996)参照〕。また、市販の蛍光標識キットを使用することもできる（例えば、アマシャム・ファルマシア社製、オリゴヌクレオチドECL 3' - オリゴラベリングシステム等）。

[0053] 本発明の検出剤は、任意の固相に固定化して用いることもできる。このため本発明の検査薬は、検出剤を固定化した基板（例えばプローブを固定化したマイクロアレイチップ等。）の形態として提供することができる。

[0054] 固定化に使用される固相は、ポリヌクレオチド等を固定化できるものであれば特に制限されることなく、例えばガラス板、ナイロンメンブレン、マイクロビーズ、シリコンチップ、キャピラリーまたはその他の基板等を挙げることができる。固相への検出剤の固定は、特に制限されない。固定方法は、例えばマイクロアレイであれば、市販のスポッター（Amersham社製など）を利用するなど、固定化プローブの種類に応じて当該技術分野で周知である〔例えば、photolithographic技術(Affymetrix社)、インクジェット技術(Rosetta Inpharmatics社)によるオリゴヌクレオチドのin situ合成等〕。

[0055] プライマーやプローブ等は、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bを選択的に（特異的に）認識するものであれば、特に限定されない。ここで、「選択的に（特異的に）認識する」とは、例えばPCR法においては内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが特異的に増幅されることを意味するが、それに限定されることなく、当業者が上記検出物または増幅物が内在性ヒトヘルペスウイルス6Bに由来するものであると判断できるものであればよい。

[0056] プライマーやプローブの具体例としては、下記（a）に記載するポリヌクレオチド並びに下記（b）に記載するポリヌクレオチド：

（a）内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／若しくは当該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、並びに

（b）内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの塩基配列若しくはそれに相補的な塩基配列にストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする、少なくとも15塩

基を有するポリヌクレオチド

からなる群より選択される少なくとも1種が挙げられる。

[0057] 相補的なポリヌクレオチド又は相補的な塩基配列（相補鎖、逆鎖）とは、内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列、または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を有するその部分配列（ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう）に対して、A:TおよびG:Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチド又は塩基配列を意味するものである。ただし、かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジентな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジентな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

[0058] プライマーやプローブ等は、例えば内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの塩基配列をもとに、例えば各種設計プログラムを利用して設計することができる。具体的には内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの塩基配列を設計プログラムにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列、若しくは少なくとも

も該配列を一部に含む配列を、プライマーまたはプローブとして使用することができる。

[0059] プライマーやプローブ等の塩基長は、上述のように連続する少なくとも15塩基の長さを有するものであれば特に制限されず、用途に応じて適宜設定することができる。塩基長としては、例えばプライマーとして用いる場合であれば、例えば15塩基～35塩基が例示でき、例えばプローブとして用いる場合であれば、例えば15塩基～35塩基が例示できる。

[0060] 本発明の検査薬には、本発明の検出剤以外の、他の検出剤（例えば、mRNA、miRNA等の核酸を検出するためのプローブや、抗体等）が含まれていてもよい。この場合の本発明の検査薬は、自己免疫疾患の他に、他の疾患や状態も検査することができる検査薬であってもよい。この場合、本発明の検出剤は、自己免疫疾患検査用の検出剤として含まれている。この観点から、本発明の検査薬は、その一態様において、本発明の検出剤からなる対象疾患検査用検出剤を含む、自己免疫疾患の検査薬である。

[0061] 本発明の検査薬は、組成物の形態であってもよい。該組成物には、必要に応じて他の成分が含まれていてもよい。他の成分としては、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられる。

[0062] 本発明の検査薬は、キットの形態であってもよい。該キットには、上記検出剤或いはこれを含む上記組成物のほかに、被検体の体液における内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出に使用し得るものを含んでいてもよい。このようなものの具体例としては、各種試薬（例えば緩衝液等）、器具（例えば生体試料の採取、精製、分離用器具）等が挙げられる。

実施例

[0063] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0064] 試験例1. 自己免疫疾患と内在性ヒトヘルペスウイルス6との関連の解析1
＜1-1. 概要＞

日本人の3,422サンプルのデータセットを解析した。サンプルの特徴、サンプル収集、WGS (Whole Genome Sequencing) プラットフォームの詳細については、後述する。WGSデータセットは、全身性エリテマトーデス (SLE) 251人、肺胞蛋白症 (PAP) 216人、多発性硬化症 (MS) 36人、健常対照 (HC) 2,919人からなる。内在性ヒトヘルペスウイルス6 (eHHV-6: 宿主の染色体ゲノムDNA内に挿入されているヒトヘルペスウイルス6のゲノムDNA) の有無を調べるために、2つのバイオインフォマティクス・パイプラインを使用した。簡潔に述べると、ヒト参照ゲノムにマッピングされなかったWGSリードを、eHHV-6参照ゲノムに再マッピングした。ロジスティック回帰とフィッシャーの正確さを用いて、eHHV-6感染状態の各疾患のリスクに関する調整オッズ比 (OR) を算出した。各疾患において、線形回帰またはロジスティック回帰とフィッシャーの検定を用いて、各疾患の臨床指標とeHHV-6感染状態との関係を推定した。

[0065] <1-2. 被検体>

集団Aとして、SLE251人、PAP216人、MS36人、HC364人からなる日本人867人を用いた。また、集団Bとして、血縁関係のない日本人のEpstein-Barrウイルス感染Bリンパ芽球細胞株から得られたHC429人のゲノムDNAを使用した。また、集団Cとして、2,126人のHCのWGSから得られたCRAMファイルを使用した。HapMap3データに対して主成分分析を実施した。東アジアの遺伝的背景を確認するため、同一人物のSNP-arrayデータを用いて主成分分析を行った。

[0066] <1-3. WGSデータの前処理>

ゲノムDNAは、集団Aの個人の全血から抽出した。集団AのDNAサンプルと集団BのDNAサンプルは、マクロジェン・ジャパン株式会社 (日本) で塩基配列を決定した。シーケンスライブラリーは、TruSeq DNA PCR-free Library Prep kit (Illumina Inc., USA) の試薬を用いて、メーカーのプロトコールに従って作成した。また、HiSeqXまたはNovaSeq (Illumina Inc., 米国) で2×150 bpペアエンド全ゲノムシーケンスを実施した。BWA-MEMアルゴリズム (バージョン0.7.13または0.7.8) を用いて、配列決定されたリードをヒト参照ビ

ルドhs37d5にアライメントした。生アラインメントのリードは、Picard Mark Duplicates (version 2.10.10 or 2.17.2) を用いて 重複のフラグを立てた。平均アラインメントリード数は、サンプルあたり3億8600万本で、平均ゲノムカバレッジは18×に相当する。集団CのWGS CRAMファイルには、サンプルあたり3億7000万本の2×150 bpペアエンドリードが含まれ、BWA-MEM (バージョン0.7.13) でhs37d5にアライメントし、Picard MarkDuplicates (バージョン2.10.10) でフォローし、平均カバー率は17×となった。合計で3,422個のBAMまたはCRAMファイルが下流解析用に準備された。

[0067] <1-4. WGSからのeHHV-6A/Bの検出>

3,422件のWGSデータセットについて、以前に開発したeHHV-6検出・再構成用バイオインフォマティクスパイプライン (PLoS Genet 17, e1009324 (2021).) を用いて、eHHV-6の検出を行う解析を行った。簡単に説明すると、ヒト参照ゲノムにマッピングされないリードを抽出し、これらのリードを参照HHV-6A (NCBI accession NC_001664.4) とHHV-6B (NC_000898.1) にマッピングし、続いて重複に対するフラグ立てを行ってPCR重複を削除した。その後、各ウイルスのマッピング深度とカバレッジを算出した。HHV-6ゲノムの5%が2×リードデプス以上でカバーされている場合、そのサンプルはeHHV-6のキャリアッジを反映しているとみなした。ここで説明したワークフローはPythonパイプラインとしてコンパイルされ、以下のGitHubリポジトリから入手できる：https://github.com/shohei-kojima/integrated_HHV6_recon。このリポジトリにある "main.py" は、ここで説明するすべてのワークフローを含んでいる。

[0068] <1-5. 統計解析>

ロジスティック回帰モデルを用いて、eHHV-6感染状態による各疾患のリスクについて、95%信頼区間 (CI) 付きの修正ケースコントロールオッズ比 (OR) を算出した。次に、年齢と性別を独立変数として、多変量ロジスティック回帰モデルを実行した。また、両側フィッシャーの正確検定を用いて、各疾患および健常対照におけるWald検定P値<0.05、Fisher検定中間P値<0.05を有意とみなした。すべての解析は、R (バージョン4.0.5) を用い、R-package M

ASS53(バージョン7.3.58)とexact2x254(バージョン1.6.6)を用いて行った。各疾患において、年齢と性別を独立変数として、線形回帰モデルまたはロジスティック回帰モデルを用いて、各疾患の臨床指標とeHHV-6感染状態との関係を推定した。臨床指標が2値である場合は、フィッシャーの検定も用いた。回帰分析では、欠損値のある症例についてリストワイズ削除を適用した。

[0069] <1-6. 結果>

eHHV-6の有病率と各疾患との関連性を表1及び図1に示す。いずれの疾患患者においても、HCと比較してeHHV-6Aの有病率に差は認められなかった。一方、eHHV-6Bは、SLE、PAP、MSの患者では、HCに比べて有意に有病率が高かった(1.6%、1.4%、2.8% vs. 0.21%; Fisher検定 mid-P = 0.0060, 0.022, and 0.085, respectively)。eHHV-6BはSLE、PAP、MSと関連しており、調整後のORはSLEで6.9 (95%CI=1.61-27.2、Wald検定P=0.0061)、PAPで7.0 (95%CI=1.43-27.7、P=0.0075)、MSで10.9 (95%CI=0.55-71.6、P=0.034)であった。これらの結果から、eHHV-6Bの保有は、これまで知られている遺伝的・環境的要因に比して大きな効果サイズでこれらの疾患のリスクに寄与していることが示唆された。

[0070] eHHV-6BとSLEの臨床指標との関連性を表2及び図2に示す。eHHV-6Bは、SLE疾患活動性指数(SLEDAI)高スコアと有意な正の相関があった(SLEのeHHV-6B陽性患者および陰性患者の平均SLEDAI = 30.5 および 6.0; $P = 1.3 \times 10^{-8}$)。eHHV-6Bを持つSLEの4人のうち3人はSLEDAIスコアが非常に高く(≥ 18)、eHHV-6Bが疾患活動性に臨床的に大きな影響を与えることが示唆された(図2)。SLEのeHHV-6B陽性者4人のうち3人は抗RNP抗体陽性で、最後の1人は抗Scl-70抗体陽性であった。SLEのeHHV-6B陽性者2名は、他の自己免疫疾患を合併していた。抗RNP抗体陽性の1人は強皮症とシェーグレン症候群、抗Scl-70抗体陽性のもう1人は強皮症と抗リン脂質症候群であった。

[0071]

[0072]

[表1]

Logistic regression and Fisher's exact test for eHHV-6A/B.												
Number of			eHHV-6A					eHHV-6B				
Disease	total samples	No.	Logistic regression			Fisher's test		Logistic regression			Fisher's test	
			(%)	Odds ratio	95% CI	Wald test <i>P</i>	<i>mid-P</i>	(%)	Odds ratio	95% CI	Wald test <i>P</i>	<i>mid-P</i>
SLE	251	0	0.0	0.0	NA	0.98	0.40	1.6	6.9	1.61–27.2	0.0061	* 0.0060
PAP	216	0	0.0	0.0	NA	0.98	0.46	1.4	7.0	1.43–27.7	0.0075	* 0.022
MS	36	0	0.0	0.0	NA	0.99	0.87	2.8	10.9	0.55–71.6	0.034	* 0.085
HC	2,919	11	0.38	1.0	—	—	—	0.21	1.0	—	—	—

* Wald test *P*-value < 0.05 and an adjusted odds ratio > 1 or Fisher's test *mid-P*-value < 0.05 and greater than HC.

[表2]

Liner or Logistic regression and Fisher’s exact test for clinical data in each disease with eHHV-6B infection states.

Explanatory variable	Diseases	Response variable	Linear / Logistic regression				Fisher’s test	
			Coefficient	Odds ratio	95% CI	Wald test <i>P</i>	<i>mid-P</i>	
eHHV-6B	SLE	SLEDAI Scores	24.7	-----	-----	1.3×10 ⁻⁸	*	-----

SLEDAI, SLE Disease Activity Index;
* Wald test *P*-value < 0.05 and regression coefficient >0 or Fisher’s test *mid-P*-value < 0.05 and greater than HC.

[0073] 試験例2. 自己免疫疾患と内在性ヒトヘルペスウイルス6との関連の解析2
NIH All of UsプログラムのWGSデータを用いて、SLEとeHHV-6の関連について

て独立した大規模再現研究を行った。コホートの参加者は遺伝的に多様であり、SLEのリスクは家系によってかなり異なるため、我々はロジスティック回帰モデルを用いて、121,494人のヨーロッパ系家系と243,247人の多家系データセット全体で関連性検定を行った。具体的には以下のとおりである。

[0074] バイオバンク規模のWGSデータセットからeHHV-6キャリアの可能性を見つけるために、高速スクリーニング法を開発した。このスクリーニングでは、マッピングされていないリードを用い、HHV-6の参照ゲノムとアラインメントすることでHHV-6リードを検出する。まず、「samtools view」コマンドを用いて、BAMまたはCRAMファイルの末尾に保存されているマッピングされていないリードを抽出し、リードをfastq形式に変換する。マッピングされていないリードの数は個体によって異なり、マッピングアルゴリズムにも影響される。計算負荷を最小限にするため、我々のスクリーニングアプローチでは、デフォルトで100万を超えるマッピングされていないリードを使用しない。テロメアリードとHHV-6の参照ゲノム中のテロメア様リピートのミスマッピングを避けるため、少なくとも1単位のテロメアリピート(TAACCC)を含むリードをフィルターする。テロメアの可能性があるリードをフィルターした後、HHV-6AおよびHHV-6Bの参照ゲノム、それぞれNCBIアクセッションNC_001664.4およびNC_000898.1に、ミスマッチペナルティ「--mp 2,1 --no-spliced-alignment」を緩和したhisat2を用いてアライメントする。計算負荷を軽減するために、HHV-6にマッピングする際にはペアエンドのリードをシングルエンドのリードとして扱う。そして、HHV-6へのマッピングに成功したリードをカウントする。HHV-6と部分的にアライメントされた非HHV-6リードのカウントを避けるため、クリッピングやインデルのないリードをカウントする。最後に、スクリーニングされたリードとHHV-6にマッピングされたリードの数を出力する。この方法は「quick_check.py」スクリプトとしてGitHub: https://github.com/shohei-kojima/integrated_HHV6_recon において利用できる。WGSリードはDRAGENによってヒトリファレンスゲノムにマッピングされているため、CRAMファイルのほとんどは100万以上のマッピングされていないリードを含んでいる。

(通常、約1500万のマッピングされていないリード)。計算負荷を軽減するため、CRAMファイルの末尾に保存されている100万リードをスクリーニングに使用した。All of Us Controlled Tier Dataset v7では、合計245,472件のデータセットをスクリーニングした。スクリーニング法でHHV-6リードが6本以上検出されたすべてのデータセットについて、integrated_HHV6_reconパッケージの「main.py」というHHV-6再構成法を適用し、eHV-6保有者を検出した。

[0075] SLEの定義には、ICD9 (710.0) およびICD10 (M32) コードによる診断を用いた。表現型の信頼性を高めるため、少なくとも1年以上離れた固有の日付に2つ以上の診断を受けた被験者を症例と定義した。日本人集団で有意なeHHV-6 Bリスクを有するもう一つの自己免疫疾患であるPAPに関しては、その超希少疾患であること(世界的に人口100万人あたり10例未満)を考慮し、再現研究は行わなかった。我々は、「solo-DR」と推定される全長eHHV-6の2コピー以上を持つ被験者を除き、全ての被験者を関連性検定に使用した。次のロジスティック回帰モデル: $SLE \sim eHHV-6 + age + age^2 + sex + top\ 10\ genetic\ PCs$ 、を用いた。高いタイプIエラーを避けるために、RパッケージSPAtest (<https://cran.r-project.org/web/packages/SPAtest/index.html>; v3.1.2) に実装されている鞍点近似を用いてスコア検定を行った。

[0076] 結果を表3に示す。日本人の発見コホートと一致し、いずれの集団においてもeHHV-6Aの有病率に関連は認められなかった ($P > 0.15$)。対照的に、eHHV-6Bは高いSLEリスクと関連しており、調整後のORはヨーロッパ系で2.7 (95%CI = 1.54-4.76; $P=0.0020$)、多祖先系で2.4 (95%CI = 1.47-3.82; $P=0.0012$) であった。これらの結果は、eHHV-6Bが多様な祖先の人々におけるSLEと関連していることを示している。

[0077]

[表3]

Replication studies of eHHV-6A/B associations with SLE in *All of Us*.

Disease	Freq. of the subjects (%)	eHHV-6A				eHHV-6B			
		No.	Odds ratio	95% CI	Score test <i>P</i>	No.	Odds ratio	95% CI	Score test <i>P</i>
European ancestry (<i>N</i> =121,494)									
SLE	<0.6	≤20*	2.3	0.90–5.79	0.15	≤20*	2.7	1.54–4.76	0.0020 †
Controls	>99.4	333	—	—	—	937	—	—	—
Multi-ancestry (<i>N</i> =243,247)									
SLE	<0.7	≤20*	1.4	0.54–3.51	0.68	≤20*	2.4	1.47–3.82	0.0012 †
Controls	>99.3	502	—	—	—	1,578	—	—	—

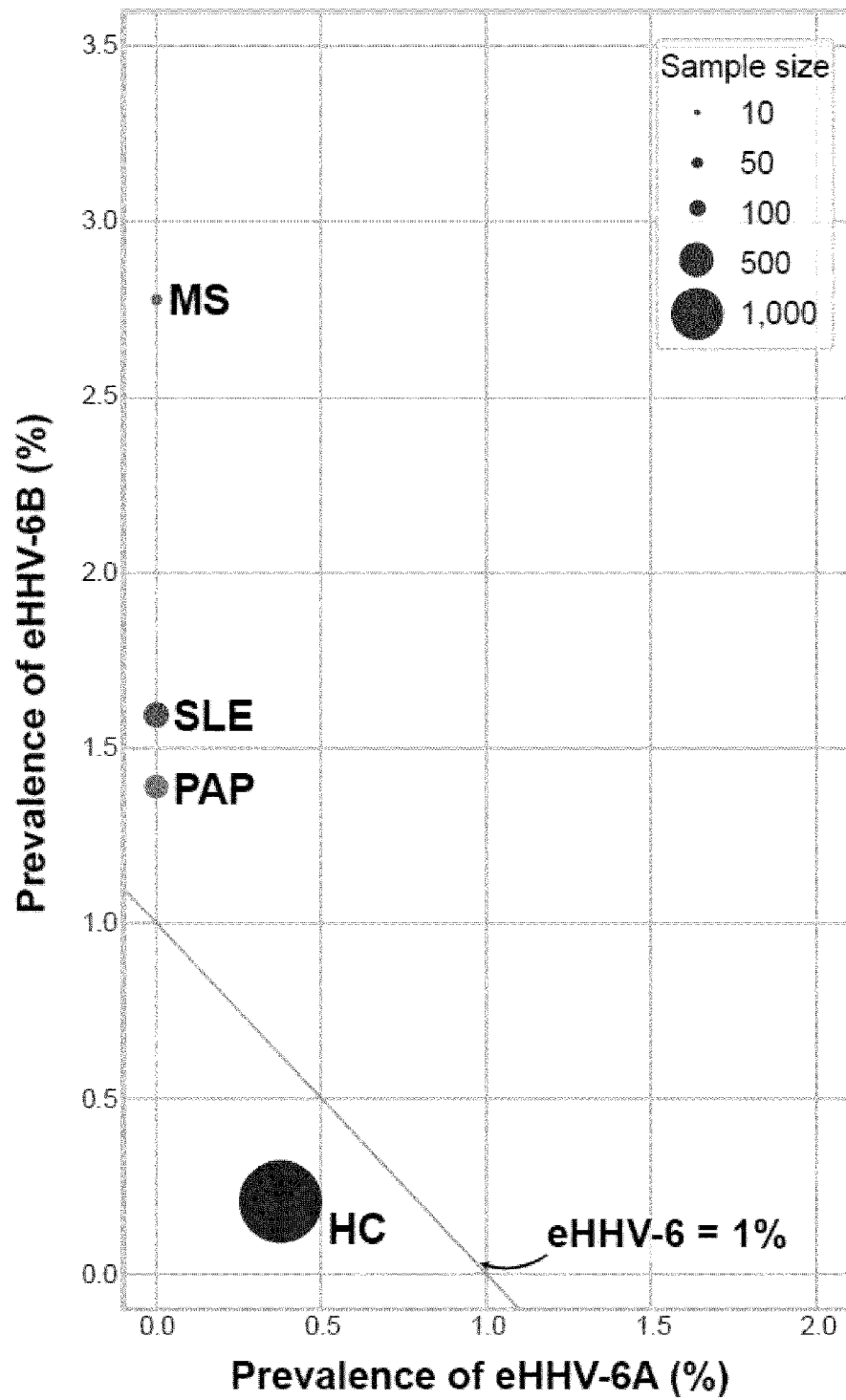
* Counts suppressed per the *All of Us* Data and Statistics Dissemination Policy.

† Score test *P*-value < 0.05/2 and an adjusted odds ratio > 1.

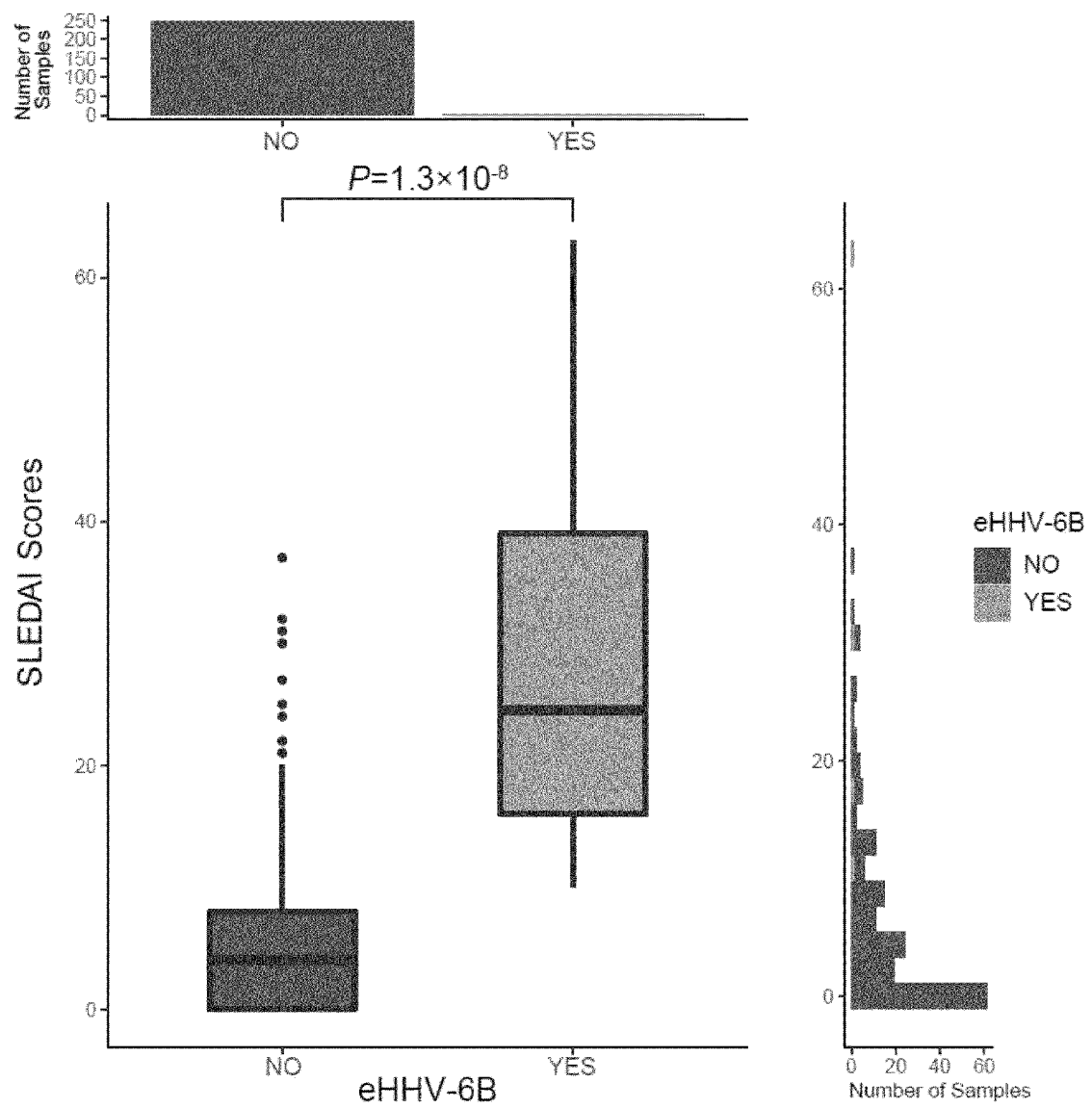
請求の範囲

- [請求項1] (1) 被検体から採取された生体試料のゲノムDNAにおける内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの有無を調べる工程を含む、自己免疫疾患を検査する方法。
- [請求項2] さらに、
- (2a) 前記工程 (1) で前記内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが検出された場合に、前記被検体が、前記自己免疫疾患に罹患している、前記自己免疫疾患の発症リスクが高い、又は前記自己免疫疾患の重症化リスクが高いと判定する工程、及び／又は
- (2b) 前記工程 (1) で前記内在性ヒトヘルペスウイルス6Bが検出されなかった場合に、前記被検体が、前記自己免疫疾患に罹患していない、前記自己免疫疾患の発症リスクが低い、又は前記自己免疫疾患の重症化リスクが低いと判定する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス、肺胞蛋白症、及び多発性硬化症からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項4] 前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス、及び肺胞蛋白症からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項5] 前記重症化リスクの判定における前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデスである、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項6] 前記生体試料が、体液、皮膚、及び粘膜からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] 日本人集団に対して適用される、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。
- [請求項8] 内在性ヒトヘルペスウイルス6Bの検出剤を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法に使用するための検査薬。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C12Q 1/6869**(2018.01)i; **C12N 15/09**(2006.01)i

FI: C12Q1/6869 Z ZNA; C12N15/09 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/6869; C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024

Registered utility model specifications of Japan 1996-2024

Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROCCOLO, Francesco et al., Possible Role of Human Herpesvirus 6 as a Trigger of Autoimmune Disease, The Scientific World Journal, 24 October 2013, vol. 1013, Article ID 867389, DOI: 10.1155/2013/867389 page 2, right column, lines 3-8	1-3, 6-8
A	page 2, right column, lines 3-8	4,5
A	JP 07-284391 A (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) 31 October 1995 (1995-10-31) claims	1-8
A	US 2001/0033844 A1 (WILSON G. B.) 25 October 2001 (2001-10-25) claim 15	1-8
A	WO 2015/199247 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 30 December 2015 (2015-12-30) claim 1	1-8
A	EP 2568046 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 13 March 2013 (2013-03-13) entire text, all drawings	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 August 2024

Date of mailing of the international search report

13 August 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018864

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/138402 A1 (CLINIGEN KK) 02 July 2020 (2020-07-02) entire text, all drawings	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/018864

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/018864

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	07-284391	A	31 October 1995	(Family: none)	
US	2001/0033844	A1	25 October 2001	EP 1263462	A1
				claim 15	
WO	2015/199247	A1	30 December 2015	US 2017/0138957	A1
				claim 1	
				EP 3163301	A1
EP	2568046	A1	13 March 2013	(Family: none)	
WO	2020/138402	A1	02 July 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
C12Q 1/6869(2018.01)i; C12N 15/09(2006.01)i
FI: C12Q1/6869 Z ZNA; C12N15/09 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
C12Q1/6869; C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922 - 1996年
日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年
日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年
日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	BROCCOLO, Francesco et al., Possible Role of Human Herpesvirus 6 as a Trigger of Autoimmune Disease, The Scientific World Journal, 2013.10.24, Vol. 2013, Article ID 867389, DOI: 10.1155/2013/867389 第2頁右欄第3-8行	1-3, 6-8
A	第2頁右欄第3-8行	4, 5
A	JP 07-284391 A (東洋紡績株式会社) 31.10.1995 (1995 - 10 - 31) 特許請求の範囲	1-8
A	US 2001/0033844 A1 (WILSON GREGORY BRUCE) 25.10.2001 (2001 - 10 - 25) Claim 15	1-8
A	WO 2015/199247 A1 (日本たばこ産業株式会社) 30.12.2015 (2015 - 12 - 30) 請求項1	1-8
A	EP 2568046 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)) 13.03.2013 (2013 - 03 - 13) 全文、全図	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“I” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
02.08.2024

国際調査報告の発送日
13.08.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）
大西 隆史 4N 1149
電話番号 03-3581-1101 内線 3891

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2020/138402 A1 (クリニジェン株式会社) 02.07.2020 (2020 - 07 - 02) 全文、全図	1-8

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/018864

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	07-284391	A	31.10.1995	(ファミリーなし)	
US	2001/0033844	A1	25.10.2001	EP 1263462	A1
				Claim 15	
WO	2015/199247	A1	30.12.2015	US 2017/0138957	A1
				Claim 1	
				EP 3163301	A1
EP	2568046	A1	13.03.2013	(ファミリーなし)	
WO	2020/138402	A1	02.07.2020	(ファミリーなし)	